

Cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* em extratos de chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*) enriquecida com fertilizante inorgânico

Cultivation of microalgae *Chlorella sorokiniana* in different extracts of chicory from the Amazon (*Eryngium foetidum*), enriched with inorganic fertilizer

Jocilene Braga dos Santos¹, Erlei Cassiano Keppeler^{1*}, Reginaldo Assêncio Machado¹,
Josileide Duarte de Farias¹,

RESUMO

As microalgas têm potencial biotecnológico, no geral com fonte de biocombustíveis e suplementos alimentares. Seu custo, entretanto, ainda é significativamente elevado. Assim, meios alternativos têm sido propostos como forma de substituir os reagentes utilizados na formulação destes meios de cultura. Plantas ricas em nutrientes, como por exemplo a chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*), pode se definir uma alternativa que favorece seu desenvolvimento visando à otimização dos cultivos para um maior crescimento algal. Nesse contexto o objetivo geral desta pesquisa foi propor uma combinação de chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*), enriquecida com a adição de fertilizante (NPK), visando aumentar a concentração de nutrientes, para reduzir os custos relacionados ao cultivo da *Chlorella sorokiniana*. Foram realizados diferentes tratamentos, com o extrato bruto de *Eryngium foetidum*, testando 2,5g, 5,0g, 10,0g e 15,0g, sob a temperatura de 25°C, onde foram incrementados com fertilizante inorgânico (NPK). Desse modo para quantificar a produtividade, no cultivo foi realizado a medição da clorofila a através do sensor óptico da sonda limnológica, enquanto o nitrato foi medido pelo método da brucina. Os parâmetros como densidade celular, clorofila a e nitrato foram analisados no intervalo de tempo de 72 horas do cultivo, por um período constante de 12 dias. Os testes de Anova e Tukey aplicados revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para densidade celular, clorofila a e nitrato. O resultado dos tratamentos revelou que quanto maior a quantidade de extrato melhor será o crescimento das algas. As correlações entre densidade celular, nitrato e clorofila a foram moderadas ou fortes. Concluiu-se que o extrato bruto da *Eryngium foetidum* foi eficiente para o cultivo, representando um meio de baixo custo para a produção e manutenção do cultivo de *Chlorella sorokiniana*.

Palavras-chave: Tecnologia, crescimento, meio de cultura, mixotrófico

¹ Universidade Federal do Acre.
*E-mail: erlei.keppeler@ufac.br

ABSTRACT

Microalgae have biotechnological potential, in general as a source of biofuels and food supplements. Their cost, however, is still significantly high. Thus, alternative media have been proposed as a way to replace the reagents used in the formulation of these culture media. Plants rich in nutrients, such as the Amazon chicory (*Eryngium foetidum*), can be defined as an alternative that favors its development in order to optimize cultures for greater algal growth. In this context, the general objective of this research was to propose a combination of Amazonian chicory (*Eryngium foetidum*), enriched with the addition of fertilizer (NPK), aiming to increase the concentration of nutrients, to reduce costs related to the cultivation of *Chlorella sorokiniana*. Different treatments were carried out, with the crude extract of *Eryngium foetidum*, testing 2.5g, 5.0g, 10.0g and 15.0g, under the temperature of 25°C, where they were increased with inorganic fertilizer (NPK). Thus to quantify the productivity, in the culture, chlorophyll a was measured by the optical sensor of the limnological probe, while nitrate was measured by the brucine method. The parameters such as cell density, chlorophyll a and nitrate were analyzed at the time interval of 72 hours of the cultivation for a constant period of 12 days. The applied Anova and Tukey tests revealed significant differences ($p < 0.05$) among the treatments for cell density, chlorophyll a and nitrate. The result of the treatments revealed that the higher the amount of extract the better the algae growth. The correlations between cell density, nitrate and chlorophyll a were moderate or strong. It was concluded that the crude extract of *Eryngium foetidum* was efficient for cultivation, representing a low cost medium for the production and maintenance of *Chlorella sorokiniana* culture.

Keywords: Technology, growth, culture medium, mixotrophic

INTRODUÇÃO

As algas unicelulares formam a base da cadeia alimentar em ecossistemas aquáticos e são utilizadas em tecnologias e várias indústrias (RIZWAN et al., 2018), sendo que o cultivo destas microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro (GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2017). Tal cultivo tem recebido atenção especial dada às suas características potenciais: ciclos de vida curtos, cultivo em águas doce, salgada, salobra e residuais, uso de terras não cultiváveis, bem como o fato de não demandar grandes áreas de produção (BHATNAGAR et al., 2010). Ademais, o cultivo de microalgas foi considerado uma estratégia de mitigação de gases de efeito estufa na qual células movidas à energia solar capturam dióxido de carbono (CO₂) (CHISTI, 2007).

As microalgas são largamente usadas na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da facilidade de cultivo, ao pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos (ARAUJO et al., 2020). Combustíveis também podem ser produzidos a partir de cultivo de microalgas, pois são capazes de captar e converter dióxido de carbono (CO₂) em hidrogênio (H₂) e oxigênio (O₂) durante a fotossíntese (GONÇALVES et al., 2015).

A composição bioquímica das microalgas está intimamente relacionada à natureza de cada espécie, aos fatores ambientais relacionados ao local de cultivo e ao meio de cultura utilizado para o seu desenvolvimento (ZAMALLOA et al., 2011). Possuem extensa capacidade de crescimento em ambientes com baixos níveis de nutrientes, produzindo uma biomassa muitas vezes rica em ácidos graxos, proteínas e carboidratos (PEREIRA, et al., 2012). As peculiaridades de crescimento e a composição das microalgas são substancialmente dependentes do tipo de cultivo, que pode ser autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Dentre os distintos tipos de cultivos os que mais se destacam são os cultivos mixotróficos pois, tendem a mostrar produtividade de biomassa bem superior ao fotoautotróficos (YANG et al., 2014). (LI et al., 2014) investigaram o crescimento de uma cepa de *Chlorella sorokiniana* Sorokin em condições fotoautotrófica,

heterotrófica e mixotrófica, tendo a glicose como fonte de carbono. Estes autores, ressaltaram que o cultivo mixotrófico apresentou os melhores resultados, sendo que a biomassa seca final foi 2,4 e 5,2 vezes maior do que os cultivos heterotróficos e fotoautotróficos, respectivamente.

No entanto, há uma dificuldade relacionada à produção de biomassa algal que é o preço dos meios de cultura comerciais que acabam elevando o custo de produção. Assim, meios alternativos têm sido propostos como forma de substituir os reagentes utilizados na formulação destes meios de cultura (GAURAV et al., 2016). Algumas pesquisas são feitas sobre condições de cultura otimizadas para fazer alta produção de biomassa e aumentar a potencialidade das microalgas de acordo com as suas vantagens (SURESHKUMAR; THOMAS, 2019).

Nesse sentido, estudos prévios consideram que o uso de fertilizantes agrícolas proporciona taxa de crescimento similar e um menor custo, que naqueles meios específicos para o cultivo de microalgas como o meio f/2 (SIMENTAL; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2002). Por exemplo, (JESUS et al., 2017), reportaram crescimento algal com alta produtividade, de *Chlorella vulgaris* em meio CHU-10 cultivada com substrato de resíduos vegetais. Por outro lado, *Ankistrodesmus gracilis* em meio à base de macrófita (*Eichhornia crassipes*) associado com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) apresentou valor nutricional similar ao meio comercial CHU-12, mostrando bons resultados para o crescimento desta alga, podendo ser utilizado o meio de macrófita para cultivo desta alga em larga escala (SIPAÚBA-TAVARES; IBARRA; FIORESI, 2009).

Diante disso, é muito importante a realização de estudos sobre o crescimento de *C. sorokiniana* em meios de cultura alternativos sob condições mixotróficas porque essa alga oferece grande potencial na produção de biomassa renovável para aplicações de bioenergia (LI, et al., 2014). Além disso, essa microalga tem sido bastante estudada em relação à sua fisiologia, genética e produção de biomassa lipídica alta (CHISTI, 2007). Assim como a produção de carotenoides que possuem uma alta importância para a indústria farmacêutica, como a luteína, violaxantina e zeaxantina, α -caroteno e β -caroteno (CORDERO et al., 2011).

Nesse contexto o objetivo geral desta pesquisa foi propor uma combinação de chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum* Linnaeus), enriquecida com a adição de fertilizante (NPK), visando aumentar a concentração de nutrientes, para reduzir os custos relacionados ao cultivo da *Chlorella sorokiniana*. Quanto aos objetivos específicos, eles são, avaliar o crescimento algal de *Chlorella sorokiniana* sob diferentes extratos de chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*), com a adição de fertilizante inorgânico (NPK); quantificar a produtividade, no cultivo de *Chlorella sorokiniana*, através da medição de clorofila a; identificar se os níveis de nitrato variam entre os tratamentos e se influenciam a produtividade; verificar as correlações entre densidade celular, nitrato e clorofila a nos diferentes tratamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Limnologia e análise de água da Universidade Federal do Acre (UFAC) – *Campus* de Cruzeiro do Sul. As cepas de *Chlorella sorokiniana* foram obtidas da Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais). Para a manutenção de cepas de algas, o laboratório foi mantido em condições assépticas, e com repicagem e armazenamento de material estéril. Em fornecimento de determinada iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes de 24 watts), cultivada em água natural com o seu pH neutro, mantida sob aeração constante, feita por mini compressor de ar, modelo Risheng, RS – 7800. A matriz celular da microalga *Chlorella sorokiniana* foi inoculada em quatro garrafas de plástico (PET) com capacidade de dois litros, onde colocamos volume útil de 1.400mL de água natural, em meio de diferentes extratos brutos da planta *Eryngium foetidum*, coletada no bairro Canela fina, e moída usando liquidificador. Posteriormente, foram pesadas as seguintes quantidades de extrato bruto de *E. foetidum*, que definiram quatro tratamentos: 2,5g, 5,0g e 10,0g e 15,0g. Todos os tratamentos foram incrementados com 2,5g de fertilizante inorgânico (NPK 15-15-20). Foi adicionado 10 mL de conteúdo contendo a microalga em cada garrafa.

A contagem de algas e medição das variáveis clorofila a e nitrato foi realizada num intervalo de tempo de 72 horas do cultivo da microalga *C. sorokiniana*, por um período constante de 12 dias. A determinação da densidade celular foi realizada, mediante a contagem de células da alga cultivada que foi realizada na câmara de Neubauer utilizando o microscópio óptico, modelo leica DM 500 na objetiva de 10x. A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células mL⁻¹).

A clorofila a foi determinada através de medição usando sensor óptico da sonda limnológica YSI 6600 (WETZEL; LIKENS, 2000), enquanto o nitrato foi medido pelo método da Brucina (APHA, 2012) usando o espectrofotômetro da marca Biospectro, modelo Spectrum. A assepsia dos sensores foi realizada previamente à cada medição.

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Com os dados experimentais de densidade celular, foram elaborados gráficos que representam as curvas de crescimento. Similarmente, os dados das concentrações de clorofila a e nitrato foram plotados em gráficos.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi determinado, para medir o grau de correlação linear entre as variáveis concentração de *Eryngium foetidum* e densidade celular. Este coeficiente também foi usado entre todas as variáveis. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (Anova), com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, com quatro repetições. Os pressupostos foram verificados por meio do Teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, para a normalidade e homogeneidade das variâncias em relação aos resíduos, respectivamente. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $\alpha = 5\%$ (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2015; GOTELLI; ELISSON, 2011). Dada a complexidade envolvida, bem como dos cálculos para a realização dos testes em evidência, as rotinas foram executadas pelos softwares GraphPad Prism versão 9.3.1 e R-project versão 4.2.0 (R CORE TEAM, 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

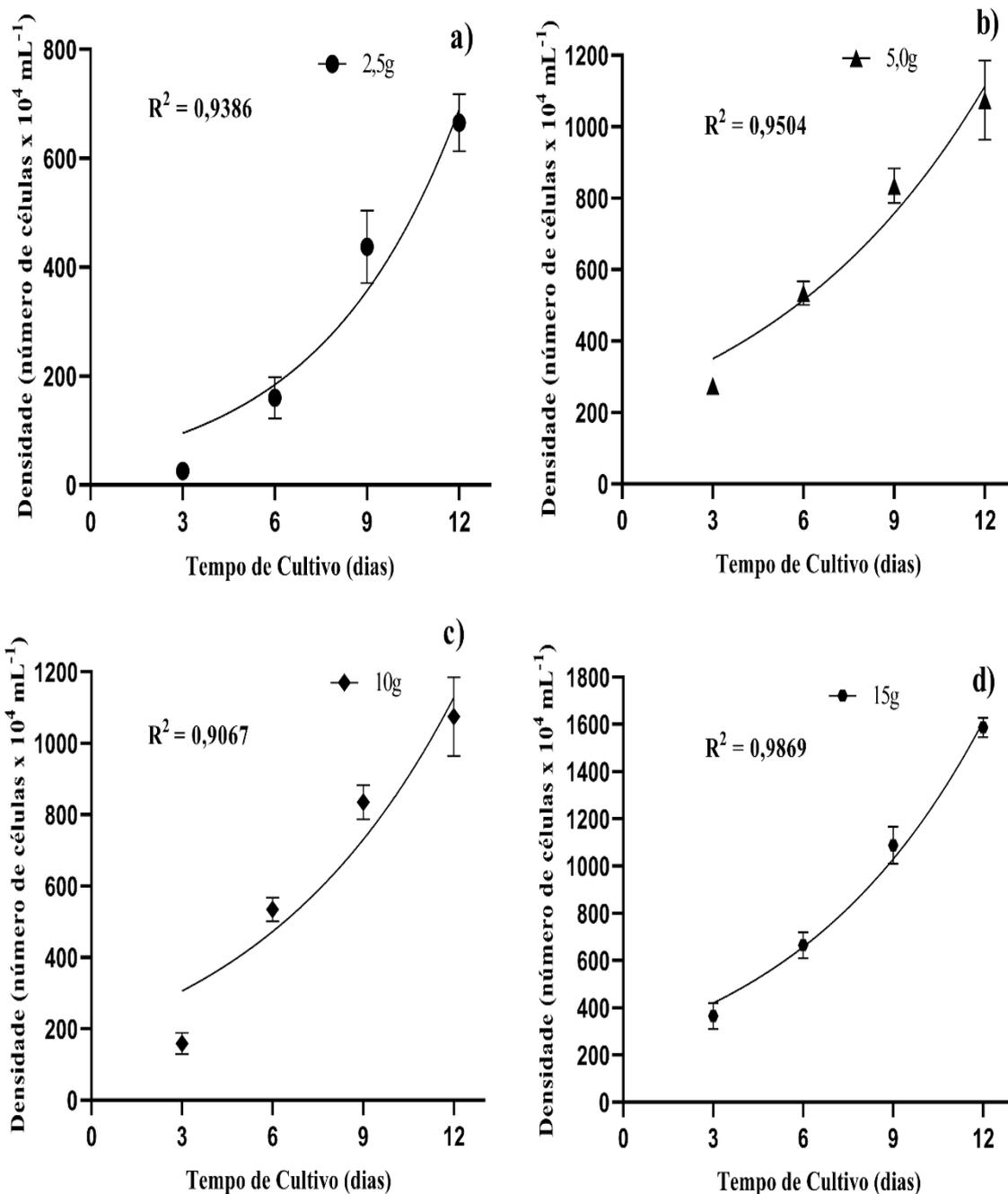
Os extratos de *Eryngium foetidum* usados no cultivo da *Chlorella sorokiniana* não apresentaram fase de adaptação, o que também ocorreu, por exemplo, no estudo de (FANKA; DUARTE; COSTA, 2015), revelando, neste estudo, um crescimento rápido, com predomínio da fase exponencial. Nos dias mensurados, a densidade celular de *Chlorella sorokiniana* mostrou-se diferente nos quatro tratamentos de cultivo e houve um aumento gradativo na densidade celular no decorrer dos dias. Tal aumento teve oscilação ao longo dos dias e foi dissimilar em todos os tratamentos.

A densidade celular de *Chlorella sorokiniana* apresentou maior número de células, atingindo, no 12º dia, o maior valor, que foi de $1620 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, quando cultivada no extrato de 15,0 g. O mesmo ocorreu para a clorofila a e o nitrato, que alcançaram valores de $32795 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $45,3002 \text{ mg.N-NO}_3\text{.L}^{-1}$, respectivamente. Logo, a concentração

de *Eryngium foetidum* que melhor apresentou níveis de crescimento para a *Chlorella sorokiniana* foi a de 15,0g, sendo, portanto, esta é a mais indicada diante das outras concentrações testadas, neste estudo.

É possível identificar as curvas de crescimento referente à densidade celular que apresentam os valores de r^2 (Figura 1a, b, c, d) para cada concentração de: 2,5g ($r^2=0,9386$), 5,0g ($r^2=0,9504$), 10,0g ($r^2=0,9067$) e 15,0g ($r^2=0,9869$). Por se tratar de uma microalga de fácil propagação (INFANTE et al., 2012), isso possibilitou que ela crescesse nas várias concentrações de extrato bruto com o coeficiente de determinação próximo de um.

Figura 1- Curvas de crescimento no meio de *Eryngium foetidum*. a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0g; d) Extrato de 15,0g.



Quanto à densidade celular, clorofila a e nitrato, foi testado se ocorreram diferenças entre os extratos, para tanto, considerando concentração, tempo, concentração x tempo, e as diferenças foram detectadas pela Anova (Tabela 1) e Tukey (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 1. Resultados da análise de variância (Anova) – Análise Fatorial. *** indica que o teste foi significativo ($p < 0,0005$).

Causa de variação	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
Concentração	1.182,6***	380,16***	128,483***
Tempo	2.192,7***	1.005,30***	164,829***
Concentração x Tempo	56,22***	36,50***	16,551***

Tabela 2. Resultados das análises do teste de Tukey para cada concentração.

Concentração	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
2,5 g	322,0 c	7.972,65 b	8.5033,67 b
5,0 g	385,9 bc	14.093,56 ab	15.090,53 b
10,0 g	650,9 ab	18.007,50 a	17.414,84 b
15,0 g	925,9 a	20.127,19 a	28.127,75 a

a,b – Para cada nível de concentração, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si

Tabela 3. Resultados das análises do teste de Tukey para o tempo de cultivo.

Tempo	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
3 dias	147,0 d	4.639,38 c	6.038,76 c
6 dias	408,8 c	11.232,32 b	13.977,79 bc
9 dias	713,8 b	21.168,56 a	22.041,16 ab
12 dias	1.015,3 a	23.160,62a	27.078,78 a

a,b – Para cada nível de tempo, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si.

Tabela 4. Resultados das análises do teste de Tukey- Análise da interação.

Densidade Celular				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	25,50 dC	160,00 cD	437,50 bC	665,00 aD
5,0 g	38,75 dC	275,00 cC	495,00 bC	735,00 aC
10,0 g	158,75 dB	535,00 cB	835,00 bB	1.075,00 aB
15,0 g	365,00 dA	665,00 cA	1.087,50 bA	1.586,25 aA
Clorofila a				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	278,3 bB	576,8 bB	14.900 aC	16.135 aC
5,0 g	576,75 dB	13.907 cA	19.820 bB	22.070 aB
10,0 g	9.165 dA	15.590 cA	25.563,25 aA	21.642 bB
15,0 g	8.537,5 dA	14.855 cA	24.321,25 bA	32.795 aA
Nitrato				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	0.331,5 bB	10.406,8 aB	9.463,0 aD	13.811,99 aC
5,0 g	7.422,5 cA	13.276,3 bB	15.087,34 bC	24.575,91 aB
10,0 g	8.493,80 bA	11.529,12 bB	22.866,95 aB	26.769,5 aB
15,0 g	7.907,14 cA	20.698,86 bA	40.747,29 aA	43.157,7 aA

a,b – Para cada nível de concentração, médias de tempo seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si; A,B – Para cada nível de tempo, médias das concentrações seguidas de mesma letra MAIÚSCULA não diferem entre si

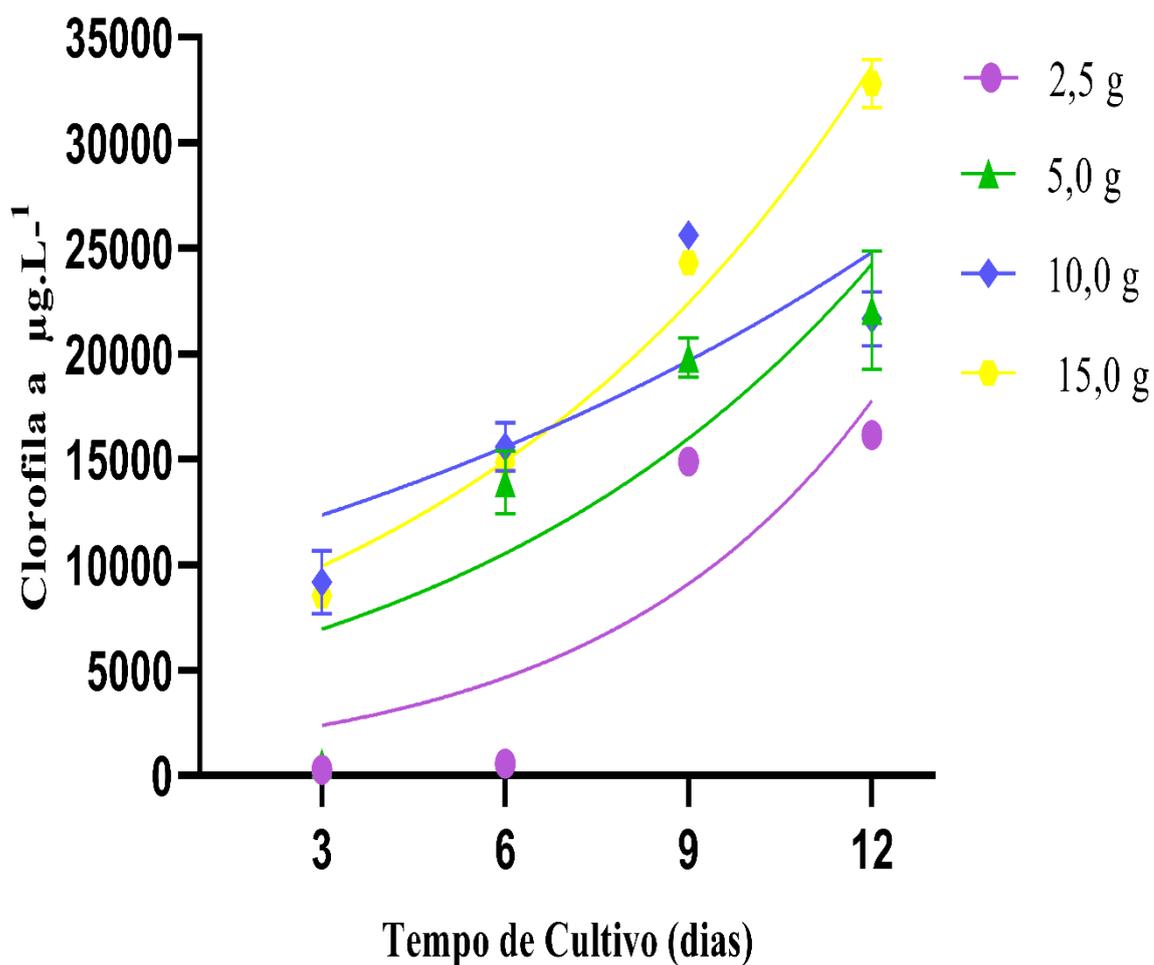
Como *Chlorella sorokiniana* pôde crescer bem, mixotroficamente, provavelmente, a *Eryngium foetidum* presente no meio deste experimento pode ter-se mostrado uma fonte de carbono aceitável na predominância da fase exponencial, durante todo o experimento e em todos os tratamentos. Portanto, essa microalga foi capaz de metabolizar essa fonte de carbono, assim, atingindo altas concentrações celulares.

De acordo com (BELKOURA; BENIDER; DAUTA, 1997), na fase de crescimento exponencial, a biomassa algal a 35°C era composta por cerca de 40% de proteínas, 30% de carboidratos e 18% de lipídios. (CHAI et al., 2018) revelam que há, em suas propriedades, glicose, frutose, galactose e xilose. A indefinição desses elementos, neste trabalho, foi limitante até porque isso também depende do meio na qual ela cresce. Este meio, com adição de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) à

Eryngium foetidum, que a teve como componente principal. Essa leguminosa é caracterizada pela presença nas folhas de flavonoides, taninos, saponinas e vários triterpenoides (PAUL; SEAFORTH; TIKASINGH, 2011) e o óleo contém alta quantidade de aldeídos acíclicos e compostos aromáticos (THOMAS et al., 2017).

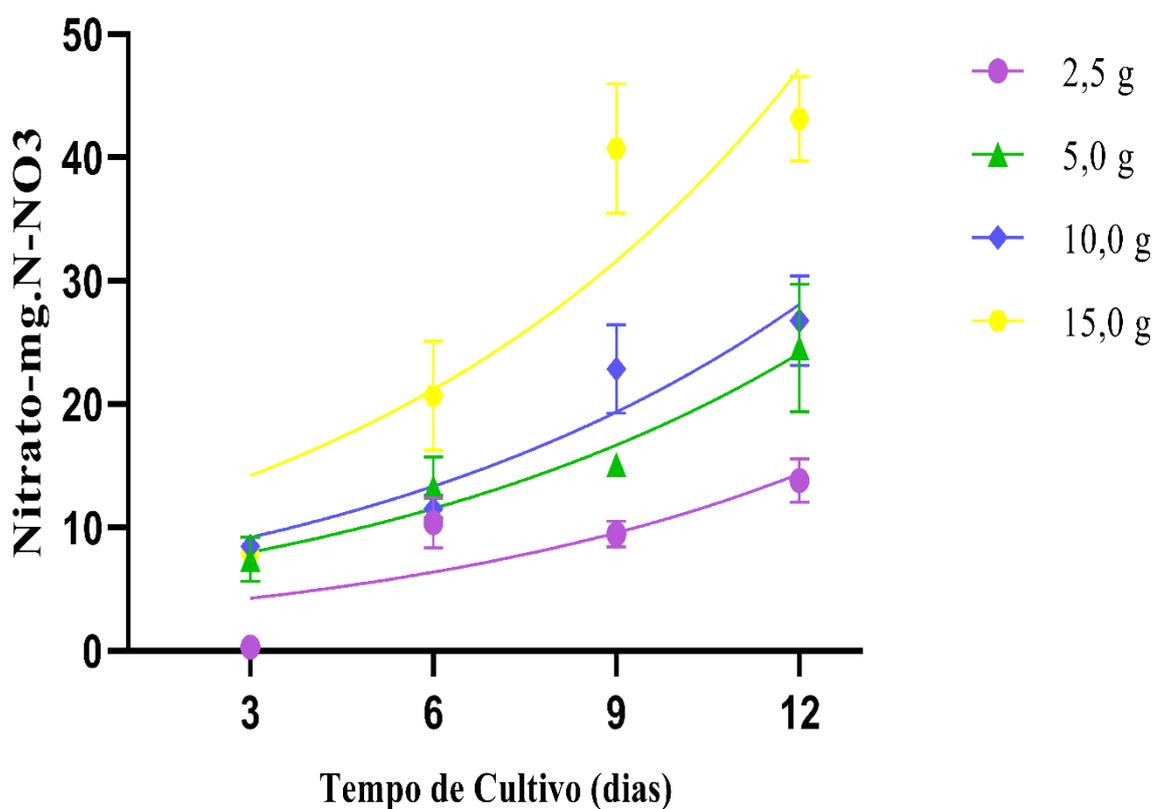
Neste experimento, o rendimento de clorofila a (Figura 2) foi mais alto nos extratos de 10,0 e 15,0 g, especialmente, entre os dias 9 e 12. No experimento em tela, o máximo de produção de clorofila a foi de 32795 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Esses resultados foram maiores que aqueles reportados por (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013), em que relataram que a produção de clorofila pelo fitoplâncton é influenciada pelas condições de crescimento.

Figura 2- Clorofila a no meio de *Eryngium foetidum*



O aumento na concentração de nitrato (Figura 3) foi proporcional ao aumento na produtividade de *Chlorella sorokiniana*. Resposta semelhante foi observada em experimentos envolvendo igualmente nitrato, nos quais o melhor desempenho ocorreu em concentrações altas de nitrato (PEREIRA; BRANCO, 2007).

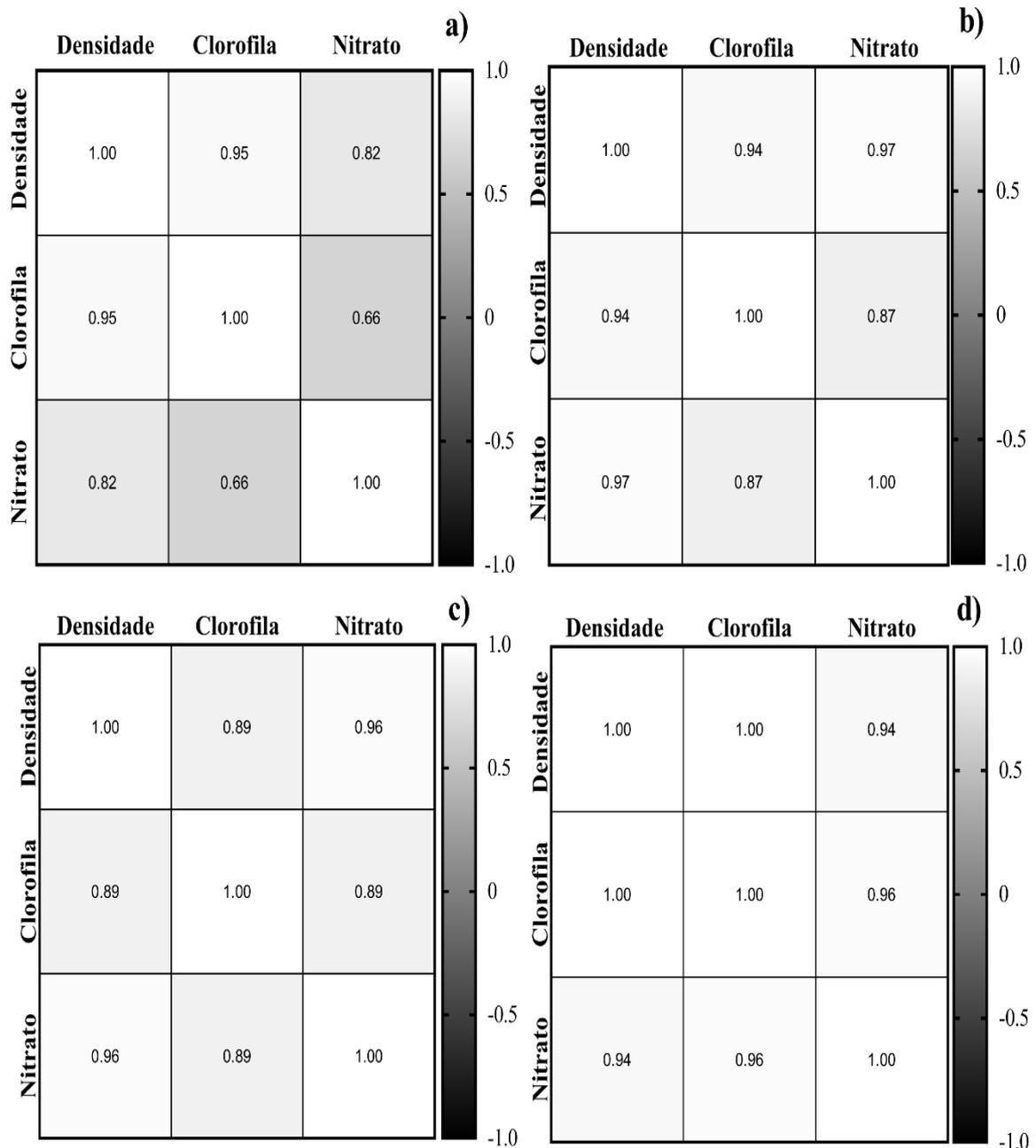
Figura 3 - Nitrato no meio de *Eryngium foetidum*



Meio de cultivo para *Chlorella* em hortaliças, como chicória, é de baixo custo por serem estas encontradas comumente em quintais. Meios dessa natureza para as commodities, que é um produto que funciona como matéria-prima, os custos de produção, tanto de capital quanto de operação, devem ser muito baixos (BENEMANN, 2013). Meios com hortaliças representam economia de recursos financeiros, visto que tais meios geram um menor custo econômico que o uso de reagentes.

A relação entre dias (tempo de cultivo) e densidade celular de *Chlorella sorokiniana* evidenciou que existe correlação forte, e a maior observada foi a do extrato de 15,0 g. Quanto às correlações entre densidade celular, nitrato e clorofila a (Figura 4a, b, c, d), nas concentrações de 2,5 g, 5,0 g, 10,0 g e 15,0 g, as correlações mais fortes foram entre densidade celular e clorofila a (1,00), nitrato e densidade celular (0,97) e clorofila a e nitrato (0,96).

Figura 4 - Correlação de Pearson (r). a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0; d) Extrato de 15,0g.



Outros meios para *Chlorella* também são reconhecidos como de baixo custo. *Chlorella sorokiniana* foi cultivada com fertilizantes foliares usados na agricultura (SILVA-BENAVIDES; MARGARITA, 2016). Por exemplo, o uso da vinhaça pré-tratada para o crescimento de microalgas de *Chlorella* sp. proporciona um destino lucrativo para um resíduo altamente poluente (CANDIDO; BERNARDO; LOMBARDI, 2021). Experimentos dessa natureza são importantes porque permitem viabilizar economicamente o cultivo de microalgas, utilizando meios de baixo custo que servem, possivelmente, para a produção de biodiesel, segundo (FRANCO et al., 2013), elaboração de produtos medicinais bioativos, produção de ingredientes

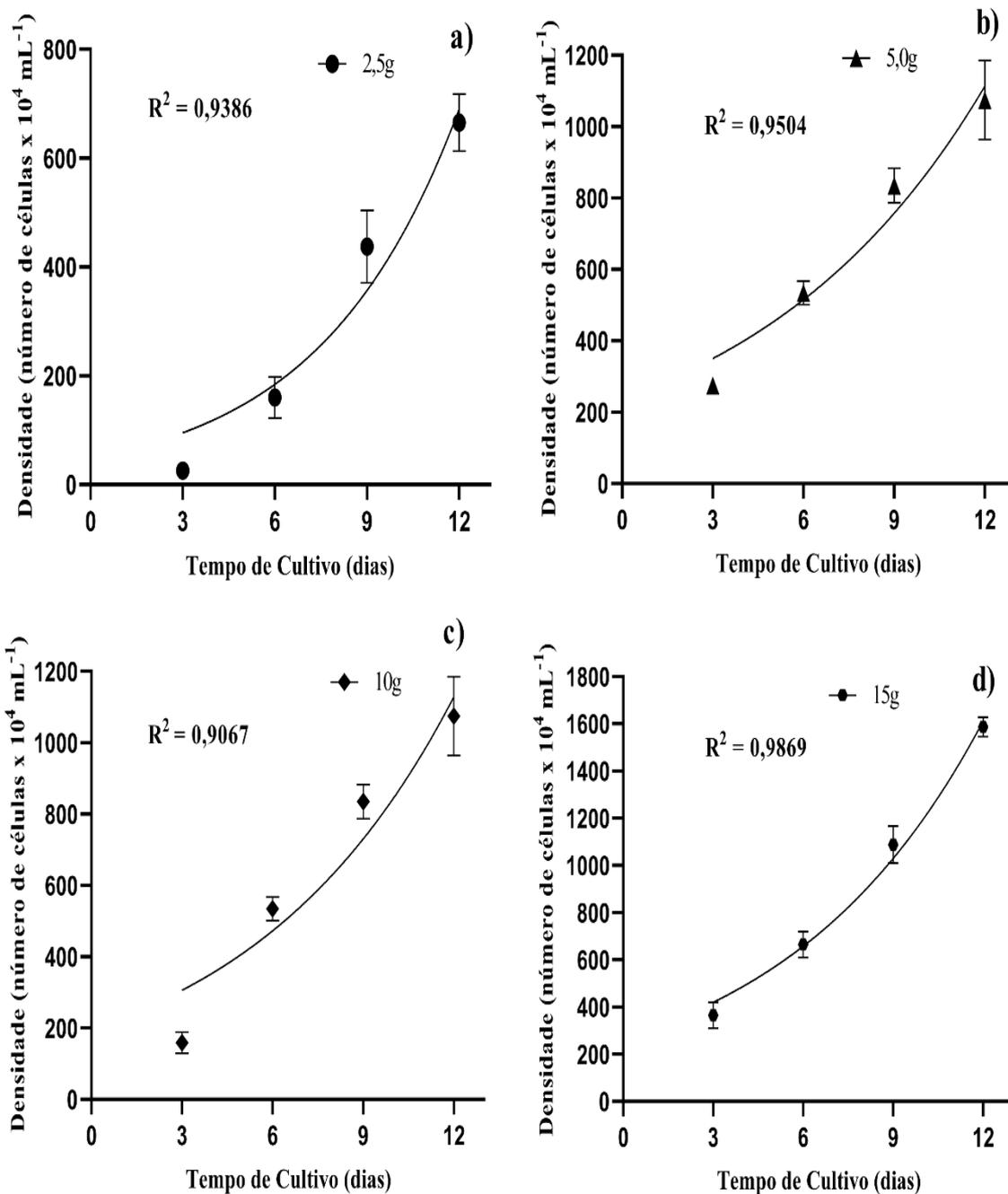
alimentares, conforme (KHAN; SHIN; KIM, 2018) e de cosméticos (DAS; AZIZ; OBBARD, 2011). Quanto à necessidade de algas limpas e o custo de produção baixo, estes aspectos demandam investigações a respeito da resposta fisiológica das algas sob condições diferentes de crescimento (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013).

Os extratos de *Eryngium foetidum* usados no cultivo da *Chlorella sorokiniana* não apresentaram fase de adaptação, o que também ocorreu, por exemplo, no estudo de (FANKA; DUARTE; COSTA, 2015), revelando, neste estudo, um crescimento rápido, com predomínio da fase exponencial. Nos dias mensurados, a densidade celular de *Chlorella sorokiniana* mostrou-se diferente nos quatro tratamentos de cultivo e houve um aumento gradativo na densidade celular no decorrer dos dias. Tal aumento teve oscilação ao longo dos dias e foi dissimilar em todos os tratamentos.

A densidade celular de *Chlorella sorokiniana* apresentou maior número de células, atingindo, no 12º dia, o maior valor, que foi de $1620 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, quando cultivada no extrato de 15,0 g. O mesmo ocorreu para a clorofila a e o nitrato, que alcançaram valores de $32795 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $45,3002 \text{ mg.N-NO}_3\text{.L}^{-1}$, respectivamente. Logo, a concentração de *Eryngium foetidum* que melhor apresentou níveis de crescimento para a *Chlorella sorokiniana* foi a de 15,0g, sendo, portanto, esta é a mais indicada diante das outras concentrações testadas, neste estudo.

É possível identificar as curvas de crescimento referente à densidade celular que apresentam os valores de r^2 (Figura 1a, b, c, d) para cada concentração de: 2,5g ($r^2= 0,9386$), 5,0g ($r^2= 0,9504$), 10,0g ($r^2=0,9067$) e 15,0g ($r^2= 0,9869$). Por se tratar de uma microalga de fácil propagação (INFANTE et al., 2012), isso possibilitou que ela crescesse nas várias concentrações de extrato bruto com o coeficiente de determinação próximo de um.

Figura 2- Curvas de crescimento no meio de *Eryngium foetidum*. a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0g; d) Extrato de 15,0g.



Quanto à densidade celular, clorofila a e nitrato, foi testado se ocorreram diferenças entre os extratos, para tanto, considerando concentração, tempo, concentração x tempo, e as diferenças foram detectadas pela Anova (Tabela 1) e Tukey (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 1. Resultados da análise de variância (Anova) – Análise Fatorial. *** indica que o teste foi significativo ($p < 0,0005$).

Causa de variação	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
Concentração	1.182,6***	380,16***	128,483***
Tempo	2.192,7***	1.005,30***	164,829***
Concentração x Tempo	56,22***	36,50***	16,551***

Tabela 2. Resultados das análises do teste de Tukey para cada concentração.

Concentração	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
2,5 g	322,0 c	7.972,65 b	8.5033,67 b
5,0 g	385,9 bc	14.093,56 ab	15.090,53 b
10,0 g	650,9 ab	18.007,50 a	17.414,84 b
15,0 g	925,9 a	20.127,19 a	28.127,75 a

a,b – Para cada nível de concentração, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si

Tabela 3. Resultados das análises do teste de Tukey para o tempo de cultivo.

Tempo	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
3 dias	147,0 d	4.639,38 c	6.038,76 c
6 dias	408,8 c	11.232,32 b	13.977,79 bc
9 dias	713,8 b	21.168,56 a	22.041,16 ab
12 dias	1.015,3 a	23.160,62a	27.078,78 a

a,b – Para cada nível de tempo, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si.

Tabela 4. Resultados das análises do teste de Tukey- Análise da interação.

Densidade Celular				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	25,50 dC	160,00 cD	437,50 bC	665,00 aD
5,0 g	38,75 dC	275,00 cC	495,00 bC	735,00 aC
10,0 g	158,75 dB	535,00 cB	835,00 bB	1.075,00 aB
15,0 g	365,00 dA	665,00 cA	1.087,50 bA	1.586,25 aA
Clorofila a				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	278,3 bB	576,8 bB	14.900 aC	16.135 aC
5,0 g	576,75 dB	13.907 cA	19.820 bB	22.070 aB
10,0 g	9.165 dA	15.590 cA	25.563,25aA	21.642 bB
15,0 g	8.537,5 dA	14.855 cA	24.321,25bA	32.795 aA
Nitrato				

Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	0.331,5 bB	10.406,8 aB	9.463,0 aD	13.811,99 aC
5,0 g	7.422,5 cA	13.276,3 bB	15.087,34bC	24.575,91 aB
10,0 g	8.493,80 bA	11.529,12bB	22.866,95aB	26.769,5 aB
15,0 g	7.907,14 cA	20.698,86bA	40.747,29Aa	43.157,7 aA

a,b – Para cada nível de concentração, médias de tempo seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si; A,B – Para cada nível de tempo, médias das concentrações seguidas de mesma letra MAIÚSCULA não diferem entre si

Como *Chlorella sorokiniana* pôde crescer bem, mixotroficamente, provavelmente, a *Eryngium foetidum* presente no meio deste experimento pode ter-se mostrado uma fonte de carbono aceitável na predominância da fase exponencial, durante todo o experimento e em todos os tratamentos. Portanto, essa microalga foi capaz de metabolizar essa fonte de carbono, assim, atingindo altas concentrações celulares.

De acordo com (BELKOURA; BENIDER; DAUTA, 1997), na fase de crescimento exponencial, a biomassa algal a 35°C era composta por cerca de 40% de proteínas, 30% de carboidratos e 18% de lipídios. (CHAI et al., 2018) revelam que há, em suas propriedades, glicose, frutose, galactose e xilose. A indefinição desses elementos, neste trabalho, foi limitante até porque isso também depende do meio na qual ela cresce. Este meio, com adição de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) à *Eryngium foetidum*, que a teve como componente principal. Essa leguminosa é caracterizada pela presença nas folhas de flavonoides, taninos, saponinas e vários triterpenoides (PAUL; SEAFORTH; TIKASINGH, 2011) e o óleo contém alta quantidade de aldeídos acíclicos e compostos aromáticos (THOMAS et al., 2017).

Neste experimento, o rendimento de clorofila a (Figura 2) foi mais alto nos extratos de 10,0 e 15,0 g, especialmente, entre os dias 9 e 12. No experimento em tela, o máximo de produção de clorofila a foi de 32795 µg.L⁻¹. Esses resultados foram maiores que aqueles reportados por (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013), em que relataram que a produção de clorofila pelo fitoplâncton é influenciada pelas condições de crescimento.

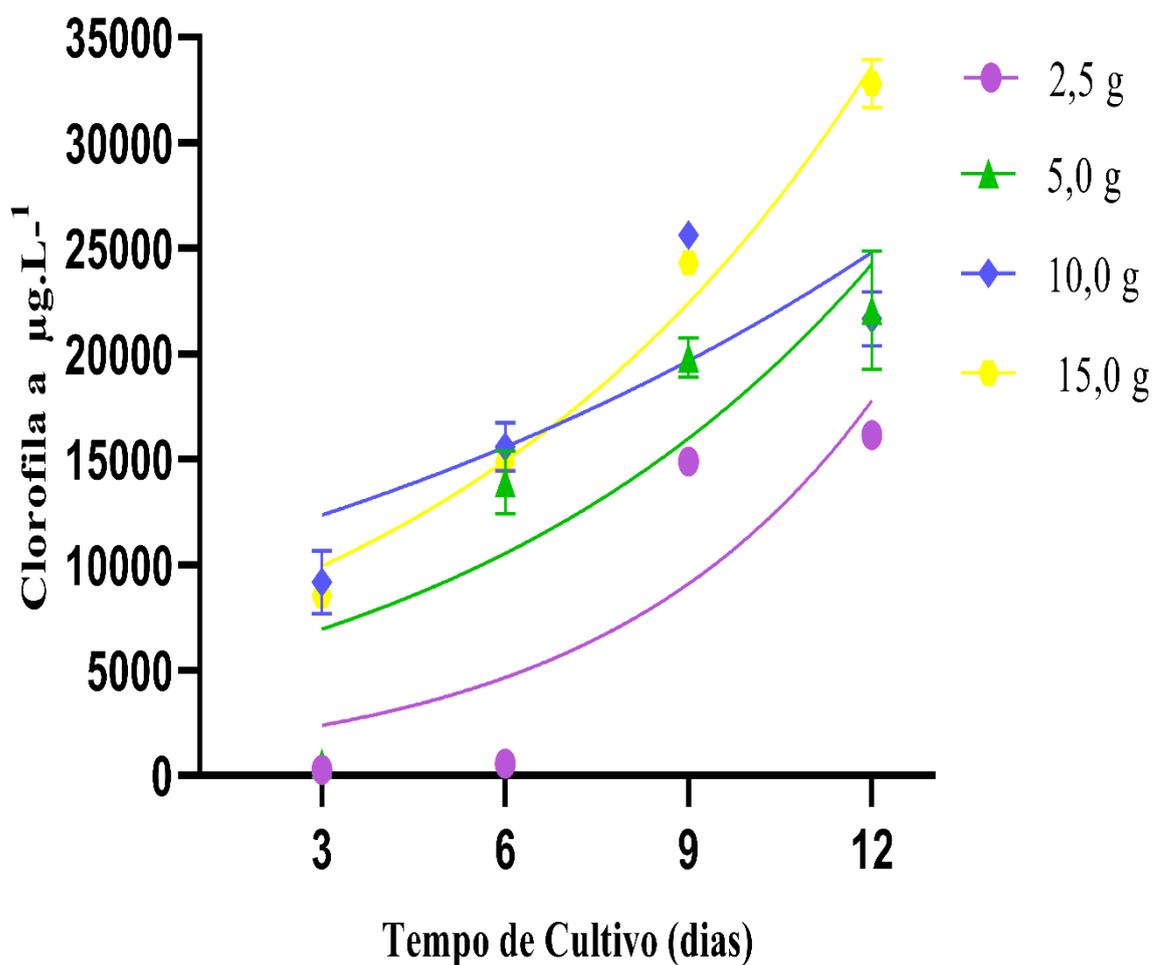


Figura 2- Clorofila a no meio de *Eryngium foetidum*.

O aumento na concentração de nitrato (Figura 3) foi proporcional ao aumento na produtividade de *Chlorella sorokiniana*. Resposta semelhante foi observada em experimentos envolvendo igualmente nitrato, nos quais o melhor desempenho ocorreu em concentrações altas de nitrato (PEREIRA; BRANCO, 2007).

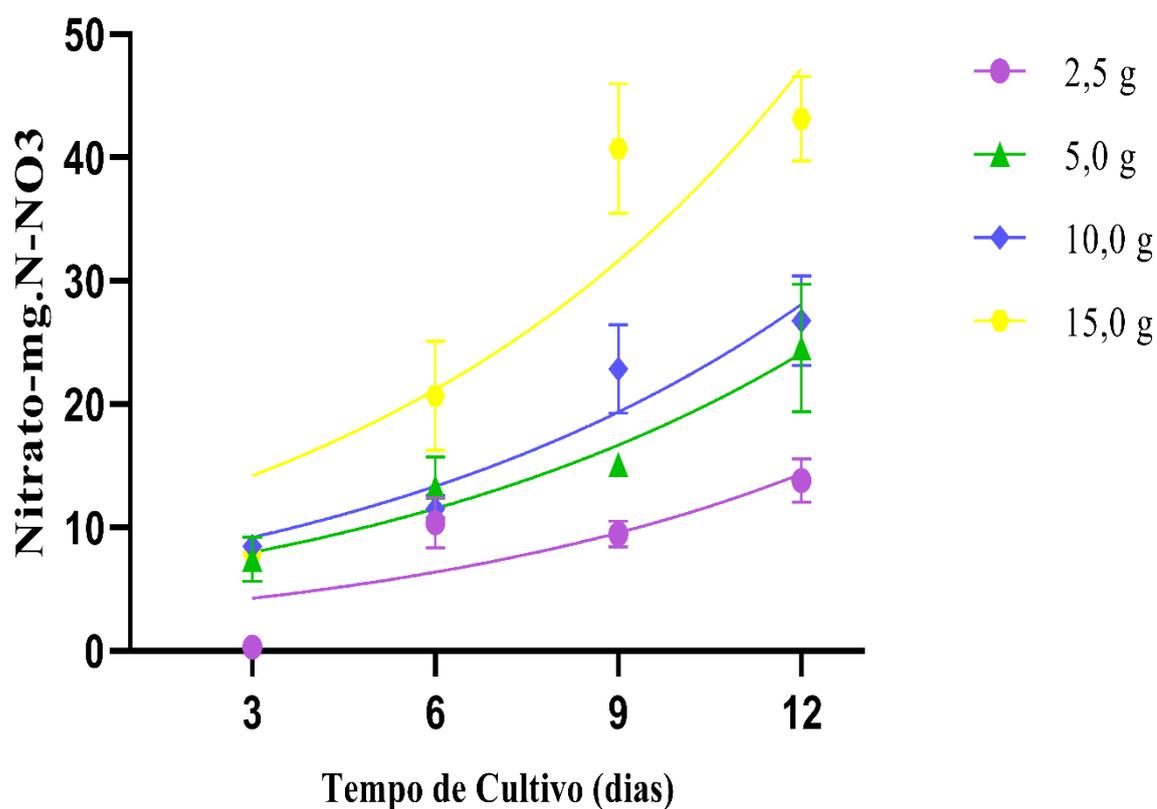
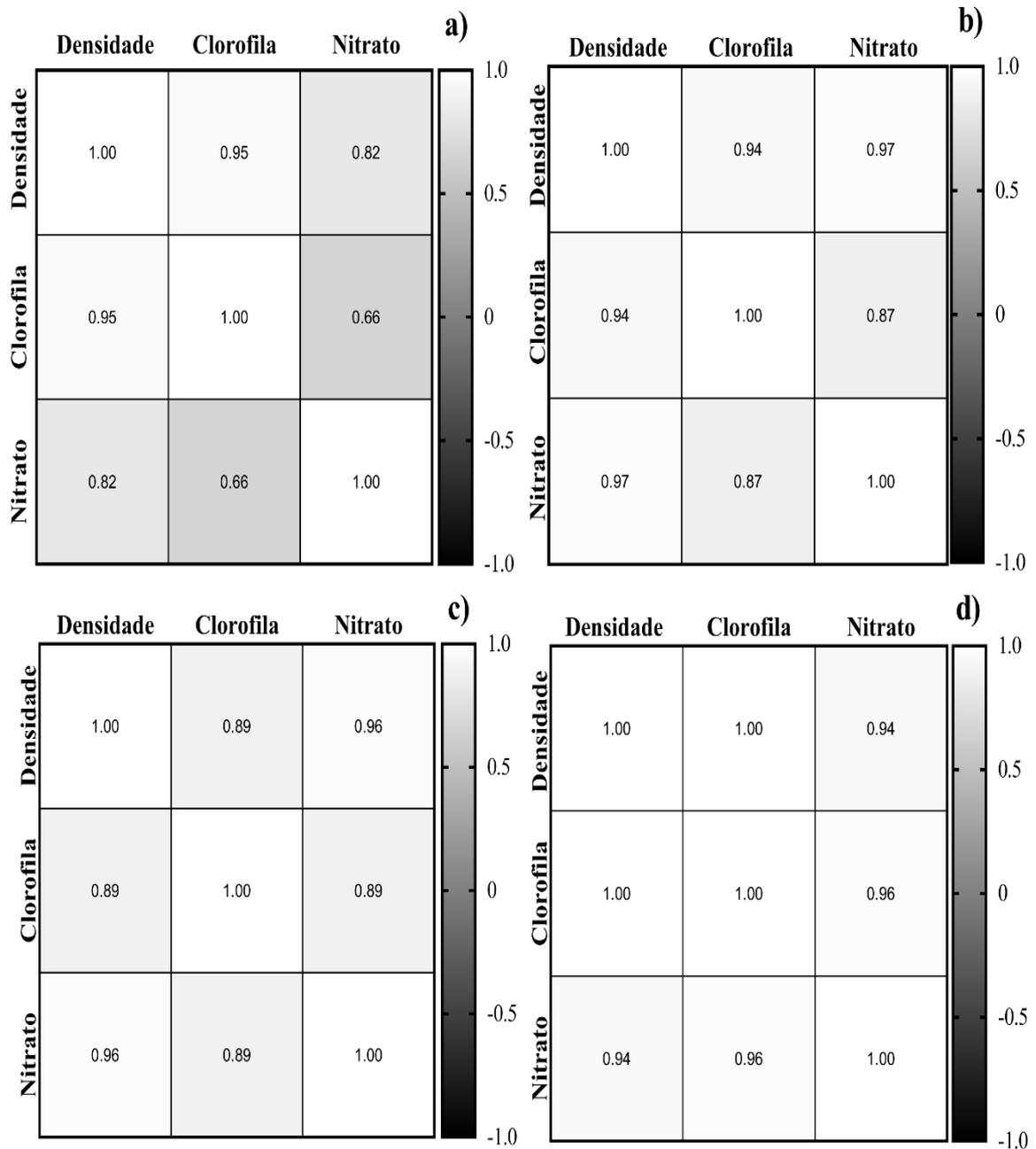


Figura 3 - Nitrato no meio de *Eryngium foetidum*.

Meio de cultivo para *Chlorella* em hortaliças, como chicória, é de baixo custo por serem estas encontradas comumente em quintais. Meios dessa natureza para as commodities, que é um produto que funciona como matéria-prima, os custos de produção, tanto de capital quanto de operação, devem ser muito baixos (BENEMANN, 2013). Meios com hortaliças representam economia de recursos financeiros, visto que tais meios geram um menor custo econômico que o uso de reagentes.

A relação entre dias (tempo de cultivo) e densidade celular de *Chlorella sorokiniana* evidenciou que existe correlação forte, e a maior observada foi a do extrato de 15,0 g. Quanto às correlações entre densidade celular, nitrato e clorofila a (Figura 4a, b, c, d), nas concentrações de 2,5 g, 5,0 g, 10,0 g e 15,0 g, as correlações mais fortes foram entre densidade celular e clorofila a (1,00), nitrato e densidade celular (0,97) e clorofila a e nitrato (0,96).

Figura 4 - Correlação de Pearson (r). a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0; d) Extrato de 15,0g.



Outros meios para *Chlorella* também são reconhecidos como de baixo custo *Chlorella sorokiniana* foi cultivada com fertilizantes foliares usados na agricultura (SILVA-BENAVIDES; MARGARITA, 2016). Por exemplo, o uso da vinhaça pré-tratada para o crescimento de microalgas de *Chlorella* sp. proporciona um destino lucrativo para um resíduo altamente poluente (CANDIDO; BERNARDO; LOMBARDI, 2021). Experimentos dessa natureza são importantes porque permitem viabilizar

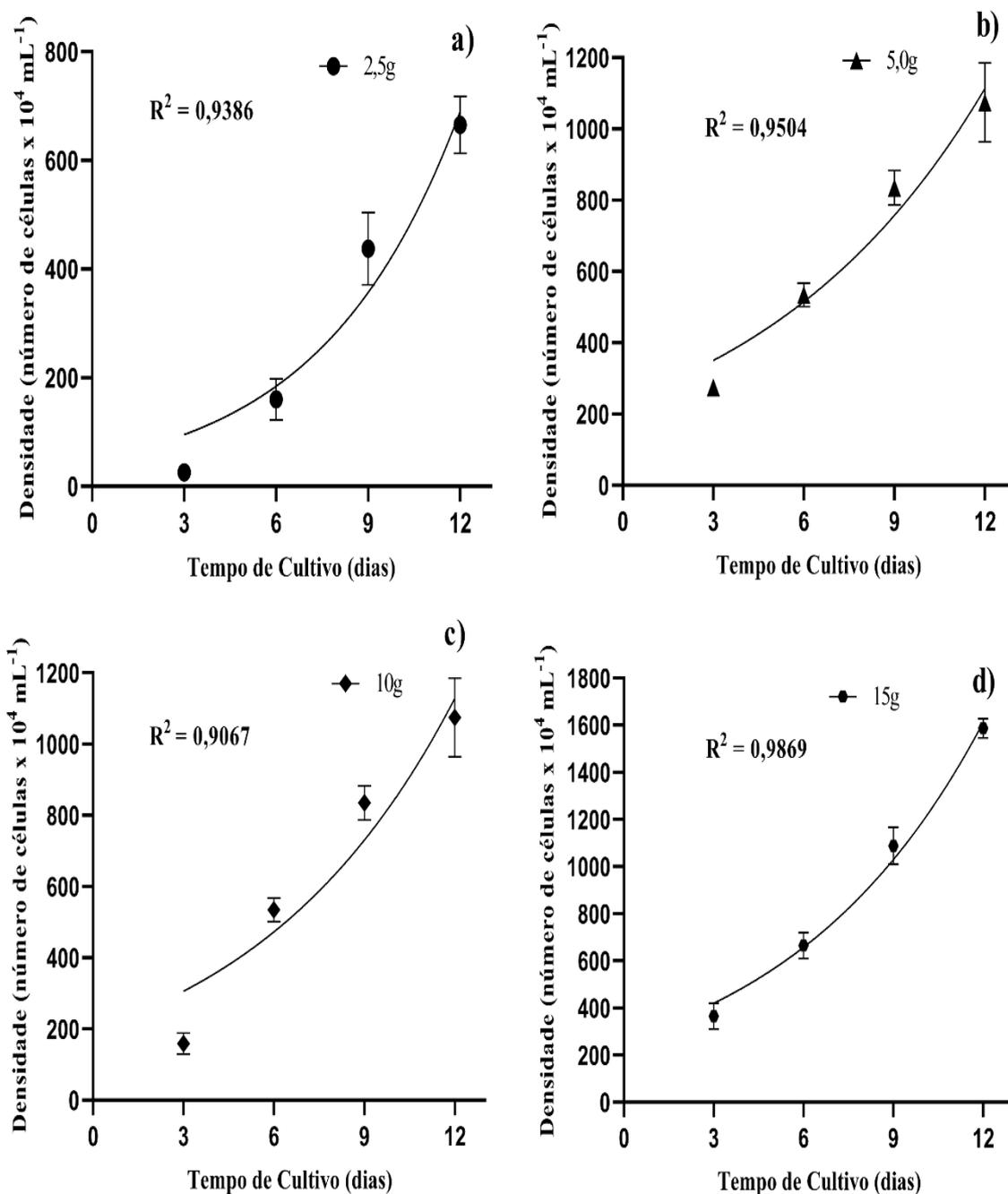
economicamente o cultivo de microalgas, utilizando meios de baixo custo que servem, possivelmente, para a produção de biodiesel, segundo (FRANCO et al., 2013), elaboração de produtos medicinais bioativos, produção de ingredientes alimentares, conforme (KHAN; SHIN; KIM, 2018) e de cosméticos (DAS; AZIZ; OBBARD, 2011). Quanto à necessidade de algas limpas e o custo de produção baixo, estes aspectos demandam investigações a respeito da resposta fisiológica das algas sob condições diferentes de crescimento (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013).

Os extratos de *Eryngium foetidum* usados no cultivo da *Chlorella sorokiniana* não apresentaram fase de adaptação, o que também ocorreu, por exemplo, no estudo de (FANKA; DUARTE; COSTA, 2015), revelando, neste estudo, um crescimento rápido, com predomínio da fase exponencial. Nos dias mensurados, a densidade celular de *Chlorella sorokiniana* mostrou-se diferente nos quatro tratamentos de cultivo e houve um aumento gradativo na densidade celular no decorrer dos dias. Tal aumento teve oscilação ao longo dos dias e foi dissimilar em todos os tratamentos.

A densidade celular de *Chlorella sorokiniana* apresentou maior número de células, atingindo, no 12º dia, o maior valor, que foi de $1620 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, quando cultivada no extrato de 15,0 g. O mesmo ocorreu para a clorofila a e o nitrato, que alcançaram valores de $32795 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $45,3002 \text{ mg.N-NO}_3\text{.L}^{-1}$, respectivamente. Logo, a concentração de *Eryngium foetidum* que melhor apresentou níveis de crescimento para a *Chlorella sorokiniana* foi a de 15,0g, sendo, portanto, esta é a mais indicada diante das outras concentrações testadas, neste estudo.

É possível identificar as curvas de crescimento referente à densidade celular que apresentam os valores de r^2 (Figura 1a, b, c, d) para cada concentração de: 2,5g ($r^2= 0,9386$), 5,0g ($r^2= 0,9504$), 10,0g ($r^2=0,9067$) e 15,0g ($r^2= 0,9869$). Por se tratar de uma microalga de fácil propagação (INFANTE et al., 2012), isso possibilitou que ela crescesse nas várias concentrações de extrato bruto com o coeficiente de determinação próximo de um.

Figura 3- Curvas de crescimento no meio de *Eryngium foetidum*. a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0g; d) Extrato de 15,0g.



Quanto à densidade celular, clorofila a e nitrato, foi testado se ocorreram diferenças entre os extratos, para tanto, considerando concentração, tempo, concentração x tempo, e as diferenças foram detectadas pela Anova (Tabela 1) e Tukey (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 1. Resultados da análise de variância (Anova) – Análise Fatorial. *** indica que o teste foi significativo ($p < 0,0005$).

Causa de variação	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
Concentração	1.182,6***	380,16***	128,483***
Tempo	2.192,7***	1.005,30***	164,829***
Concentração x Tempo	56,22***	36,50***	16,551***

Tabela 2. Resultados das análises do teste de Tukey para cada concentração.

Concentração	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
2,5 g	322,0 c	7.972,65 b	8.5033,67 b
5,0 g	385,9 bc	14.093,56 ab	15.090,53 b
10,0 g	650,9 ab	18.007,50 a	17.414,84 b
15,0 g	925,9 a	20.127,19 a	28.127,75 a

a,b – Para cada nível de concentração, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si

Tabela 3. Resultados das análises do teste de Tukey para o tempo de cultivo.

Tempo	Densidade Celular	Clorofila a	Nitrato
3 dias	147,0 d	4.639,38 c	6.038,76 c
6 dias	408,8 c	11.232,32 b	13.977,79 bc
9 dias	713,8 b	21.168,56 a	22.041,16 ab
12 dias	1.015,3 a	23.160,62a	27.078,78 a

a,b – Para cada nível de tempo, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si.

Tabela 4. Resultados das análises do teste de Tukey- Análise da interação.

Densidade Celular				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	25,50 dC	160,00 cD	437,50 bC	665,00 aD
5,0 g	38,75 dC	275,00 cC	495,00 bC	735,00 aC
10,0 g	158,75 dB	535,00 cB	835,00 bB	1.075,00 aB
15,0 g	365,00 dA	665,00 cA	1.087,50 bA	1.586,25 aA
Clorofila a				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	278,3 bB	576,8 bB	14.900 aC	16.135 aC
5,0 g	576,75 dB	13.907 cA	19.820 bB	22.070 aB
10,0 g	9.165 dA	15.590 cA	25.563,25aA	21.642 bB
15,0 g	8.537,5 dA	14.855 cA	24.321,25bA	32.795 aA
Nitrato				
Concentrações	Tempo			
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
2,5 g	0.331,5 bB	10.406,8 aB	9.463,0 aD	13.811,99 aC
5,0 g	7.422,5 cA	13.276,3 bB	15.087,34bC	24.575,91 aB
10,0 g	8.493,80 bA	11.529,12bB	22.866,95aB	26.769,5 aB
15,0 g	7.907,14 cA	20.698,86bA	40.747,29aA	43.157,7 aA

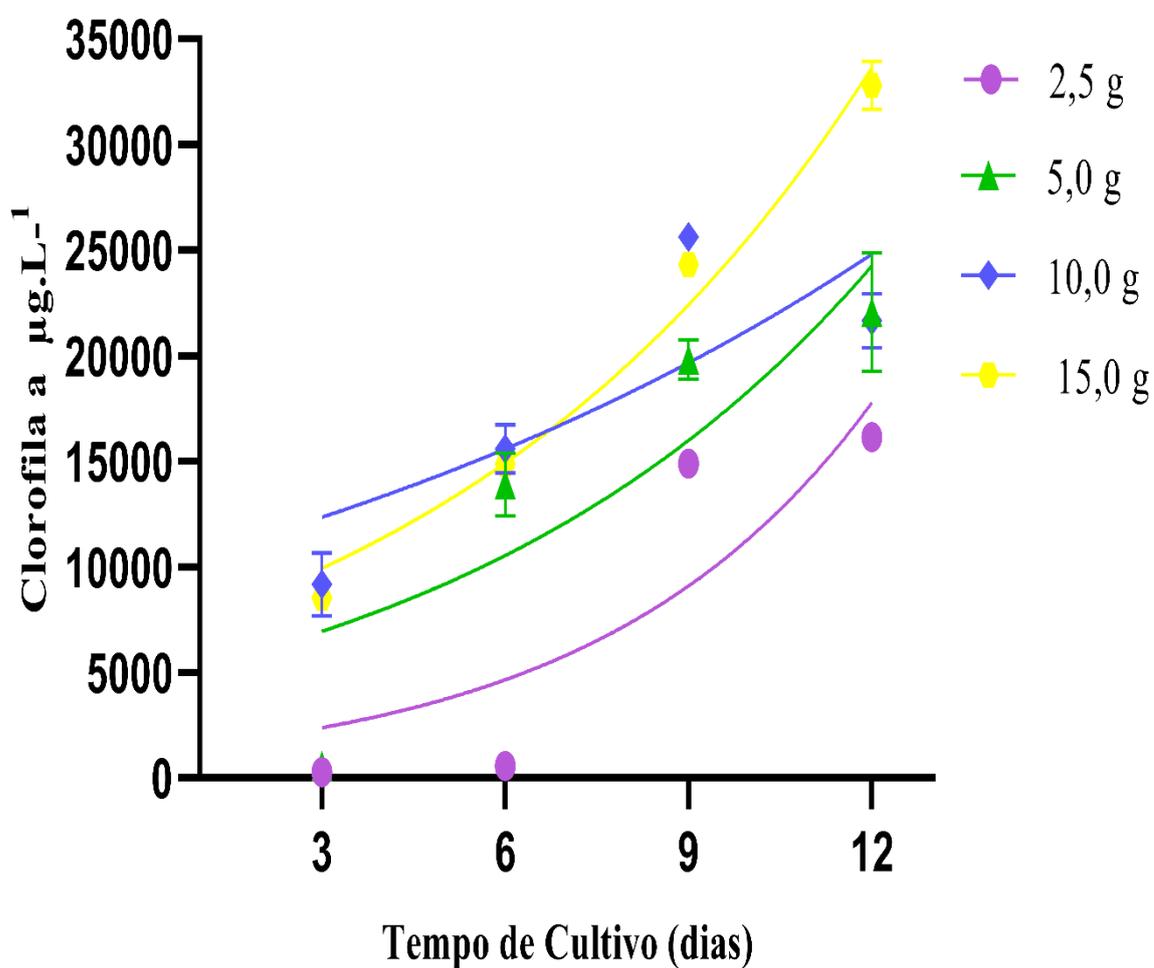
a,b – Para cada nível de concentração, médias de tempo seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si; A,B – Para cada nível de tempo, médias das concentrações seguidas de mesma letra MAIÚSCULA não diferem entre si

Como *Chlorella sorokiniana* pôde crescer bem, mixotroficamente, provavelmente, a *Eryngium foetidum* presente no meio deste experimento pode ter-se mostrado uma fonte de carbono aceitável na predominância da fase exponencial, durante todo o experimento e em todos os tratamentos. Portanto, essa microalga foi capaz de metabolizar essa fonte de carbono, assim, atingindo altas concentrações celulares.

De acordo com (BELKOURA; BENIDER; DAUTA, 1997), na fase de crescimento exponencial, a biomassa algal a 35°C era composta por cerca de 40% de proteínas, 30% de carboidratos e 18% de lipídios. (CHAI et al., 2018) revelam que há, em suas propriedades, glicose, frutose, galactose e xilose. A indefinição desses elementos, neste trabalho, foi limitante até porque isso também depende do meio na qual ela cresce. Este meio, com adição de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) à *Eryngium foetidum*, que a teve como componente principal. Essa leguminosa é caracterizada pela presença nas folhas de flavonoides, taninos, saponinas e vários

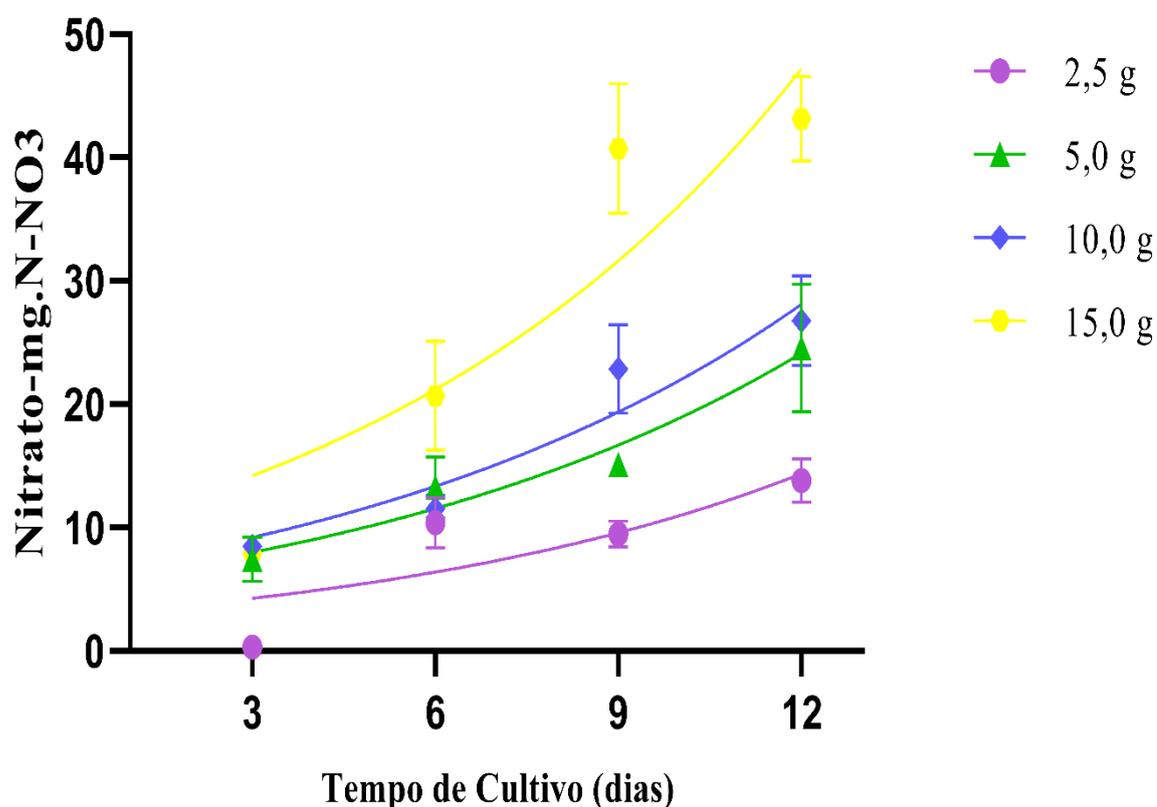
triterpenoides (PAUL; SEAFORTH; TIKASINGH, 2011) e o óleo contém alta quantidade de aldeídos acíclicos e compostos aromáticos (THOMAS et al., 2017). Neste experimento, o rendimento de clorofila a (Figura 2) foi mais alto nos extratos de 10,0 e 15,0 g, especialmente, entre os dias 9 e 12. No experimento em tela, o máximo de produção de clorofila a foi de 32795 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Esses resultados foram maiores que aqueles reportados por (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013), em que relataram que a produção de clorofila pelo fitoplâncton é influenciada pelas condições de crescimento.

Figura 2- Clorofila a no meio de *Eryngium foetidum*



O aumento na concentração de nitrato (Figura 3) foi proporcional ao aumento na produtividade de *Chlorella sorokiniana*. Resposta semelhante foi observada em experimentos envolvendo igualmente nitrato, nos quais o melhor desempenho ocorreu em concentrações altas de nitrato (PEREIRA; BRANCO, 2007).

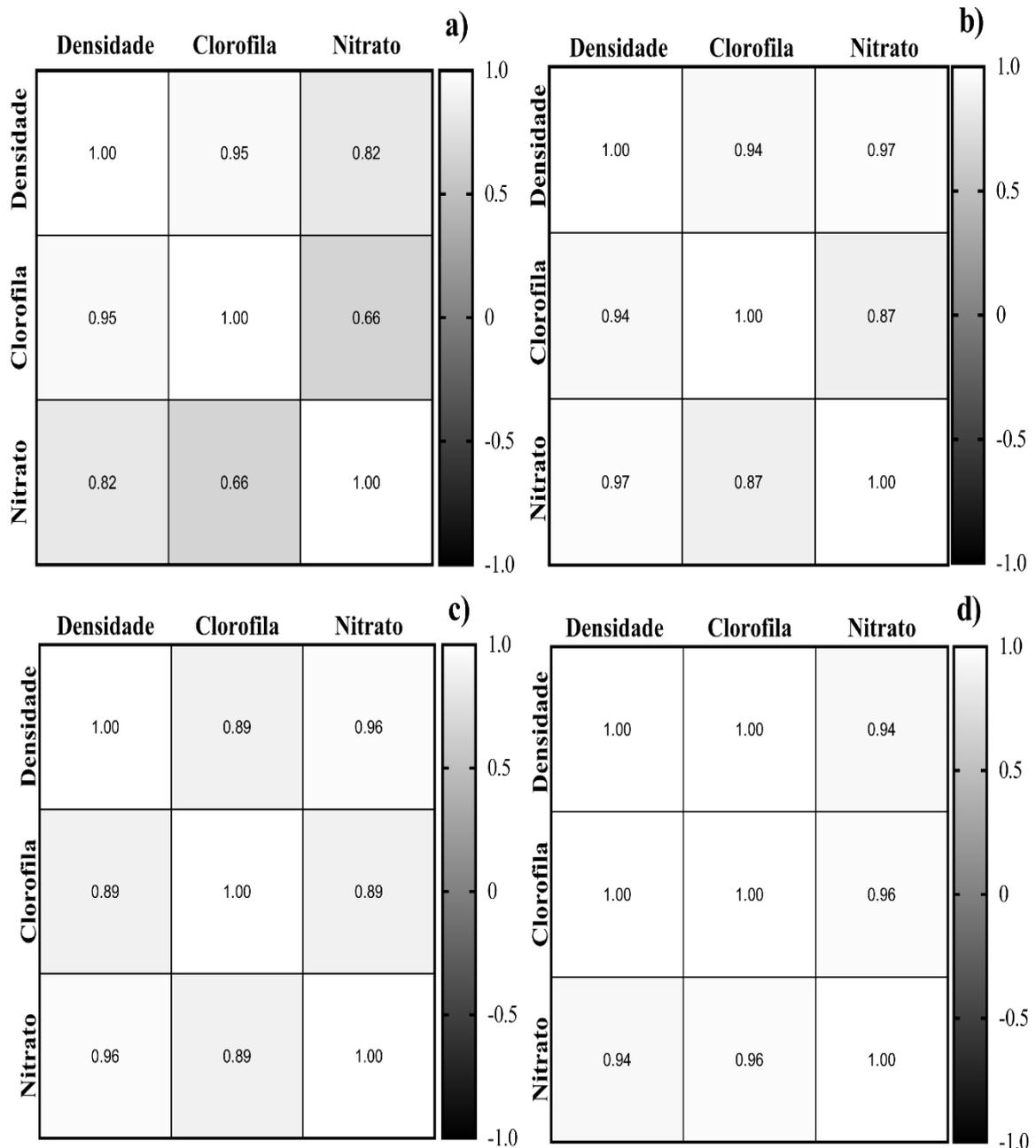
Figura 3 - Nitrato no meio de *Eryngium foetidum*



Meio de cultivo para *Chlorella* em hortaliças, como chicória, é de baixo custo por serem estas encontradas comumente em quintais. Meios dessa natureza para as commodities, que é um produto que funciona como matéria-prima, os custos de produção, tanto de capital quanto de operação, devem ser muito baixos (BENEMANN, 2013). Meios com hortaliças representam economia de recursos financeiros, visto que tais meios geram um menor custo econômico que o uso de reagentes.

A relação entre dias (tempo de cultivo) e densidade celular de *Chlorella sorokiniana* evidenciou que existe correlação forte, e a maior observada foi a do extrato de 15,0 g. Quanto às correlações entre densidade celular, nitrato e clorofila a (Figura 4a, b, c, d), nas concentrações de 2,5 g, 5,0 g, 10,0 g e 15,0 g, as correlações mais fortes foram entre densidade celular e clorofila a (1,00), nitrato e densidade celular (0,97) e clorofila a e nitrato (0,96).

Figura 4 - Correlação de Pearson (r). a) Extrato de 2,5g; b) Extrato de 5,0g; c) Extrato de 10,0; d) Extrato de 15,0g



Outros meios para *Chlorella* também são reconhecidos como de baixo custo. *Chlorella sorokiniana* foi cultivada com fertilizantes foliares usados na agricultura (SILVA-BENAVIDES; MARGARITA, 2016). Por exemplo, o uso da vinhaça pré-tratada para o crescimento de microalgas de *Chlorella* sp. proporciona um destino lucrativo para um resíduo altamente poluente (CANDIDO; BERNARDO; LOMBARDI, 2021). Experimentos dessa natureza são importantes porque permitem viabilizar economicamente o cultivo de microalgas, utilizando meios de baixo custo que servem, possivelmente, para a produção de biodiesel, segundo (FRANCO et al., 2013), elaboração de produtos medicinais bioativos, produção de ingredientes

alimentares, conforme (KHAN; SHIN; KIM, 2018) e de cosméticos (DAS; AZIZ; OBBARD, 2011). Quanto à necessidade de algas limpas e o custo de produção baixo, estes aspectos demandam investigações a respeito da resposta fisiológica das algas sob condições diferentes de crescimento (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013).

CONCLUSÃO

Microalgas, como *Chlorella sorokiniana*, crescem em diferentes meios alternativos de cultivo. Nesta pesquisa, utilizamos um tipo de hortaliça e vimos que, os melhores extratos brutos de *E. foetidum* que promoveram maior crescimento algal, foram os dois maiores.

Quanto à clorofila a o rendimento foi maior nos maiores extratos brutos. Aparentemente, devido à produção de clorofila a ter sido observada crescendo infinitamente, possivelmente não houve limitação de crescimento desta alga devido à disponibilidade de nutrientes no meio de cultura.

O aumento verificado na concentração de nitrato acompanhou o aumento na produtividade, apontado pelas correlações fortes. Fato similar foi observado também para densidade celular e as outras variáveis analisadas.

Concluiu-se que o extrato bruto da chicória da Amazônia (*Eryngium foetidum*) foi eficiente para o cultivo, representando um meio de baixo custo para a produção e manutenção do cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Sugere-se, para futuras investigações, testes em sistemas de larga escala, sendo, portanto, fundamentais resultados de testes iniciais em laboratório em sistemas fechados.

REFERÊNCIAS

ANDRULEVICIUTE, V. et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 83–90. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10811-013-0048-x>>.

APHA, AWWA. Association, APH, AWWA, Federation, Editors WE, EW Rice, RB Baird, AD Eaton, LS Clesceri. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, v. 22, 2012.

ARAUJO, G. S. et al. Influence of nutrients on biomass and oil yield from microalgae *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1806-6690.20200008>>.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **Experimentação Agronômica e Agroestat: Sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2015. 396 p.

BELKOURA, M.; BENIDER, A.; DAUTA, A. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, 1 mar. 1997. v. 33, n. 1, p. 3–11. Disponível em: <<http://www.limnology-journal.org/10.1051/limn/1997004>>.

BENEMANN, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, v. 6, n. 11, p. 5869–5886, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1073/6/11/5869>>.

BHATNAGAR et al. *Chlorella minutissima*—A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 523–536, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-009-8771-0>>.

CANDIDO, C.; BERNARDO, A.; LOMBARDI, A. T. Optimization and qualitative

comparison of two vinasse pre-treatments aiming at microalgae cultivation. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, n. 2, p. 359–367, 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522021000200359&tlng=en>.

CHAI, S. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana* growth properties in monosaccharide-supplemented batch culture. **Plos One**, v. 13, n. 7, 2018, p. e0199873. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0199873>>.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. D. G. G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 11 out. 2013. v. 85, n. 4, p. 1427–1438. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137652013000401427&lng=en&tlng=en>.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007000262>>.

CORDERO, B. F. et al. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.

DAS, P.; AZIZ, S. S.; OBBARD, J. P. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. **Renewable Energy**, v. 36, n. 9, p. 2524–2528, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148111000784>>.

FANKA, L. S.; DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Utilização de *Chlorella fusca* LEB 111 para Mitigação de CO₂ de Origem Termelétrica à Carvão mineral: Avaliação da Composição Bioquímica da Biomassa. São Paulo: Editora Edgard Blücher, p. 232–235, 2015. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/21818>>.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000300015&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

GAURAV, K. et al. Molasses-based growth and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* : A potential feedstock for biodiesel. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 3, p. 320–327, 2016. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15435075.2014.966268>>.

GONÇALVES, B. C. M. et al. Microalgas para produção de biohidrogênio e biodiesel.

Revista Janus, v. 12, n. 21, p. 97–112, 2015. Disponível em:

<<http://www.publicacoes.fatea.br/index.php/Janus/article/view/367/340>>.

GONZÁLEZ-DELGADO et al. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) através del diseño de medios de cultivo selectivos. **Ciencia & Tecnología Agropecuaria**, v. 18, n. 3, p. 451–461, 2017. Disponível em:

<<http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/736>>.

GOTELLI, N. J.; ELISSON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

INFANTE, E. A. et al. Cultivation of *chlorella* sp . Microalgae in batch culture : cell growth. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, p. 159–164, 2012. Disponível em:

<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627686016>>.

JESUS, S. S. et al. Potential use of vegetable waste for biofuel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 90–99, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.5002>>.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 2018. Disponível em:

<<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0879-x>>.

LI, T. et al. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204–213, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.010>>.

PAUL, J. H. A.; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: A review. **Fitoterapia**, abr. v. 82, n. 3, p. 302–308, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1000290X>>.

PEREIRA, C. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013–2018, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001000022&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

PEREIRA, J. L.; BRANCO, L. H. Z. Influência do nitrato e fosfato no crescimento de *Schizomeris leibleinii* Kützing (Chaetophorales, Chlorophyta). **Acta Botanica Brasilica**, mar. v. 21, n. 1, p. 155–162, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062007000100015&lng=pt&tlng=pt>.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2022. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032118302557>>.

SILVA-BENAVIDES; MARGARITA, A. Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. **Agronomía Mesoamericana**, v. 27, n. 2, p. 265, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24361>>.

SIMENTAL, J.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. . The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. **Aquacultural Engineering**, v. 27, n. 4, p. 265–272. 2002. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144860902000870>>.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (reisch) korsikov (chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu12 e de macrófita com NPK. **Growth (Lakeland)**, v. 35, n. 1, p. 111–118, 2009.

SURESHKUMAR, P.; THOMAS, J. Strategic growth of limnic green microalgae with phycoremediation potential for enhanced production of biomass and biomolecules for sustainable environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 34, p. 34702–34712, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-4012-9>>.

THOMAS, P. et al. *Eryngium foetidum* L. Essential Oils: Chemical Composition and Antioxidant Capacity. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 24, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2305-6320/4/2/24>>.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. Historical Records of Changes in the Productivity of Lakes. **Limnological Analyses**. New York, NY: Springer New York, 2000, p. 361–368.

YANG, S. et al. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 180–185, 2014.. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122>>.

ZAMALLOA, C. et al. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1149–1158, 2011.. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.017>>.

Recebido em: 01/12/2023

Aprovado em: 21/12/2022

Publicado em: 06/02/2023